

# INFORME FINAL

Diciembre de 2024

Título del Proyecto: “**Obtención de derivados de compuestos esteroidales para su uso en fármacos veterinarios**”

Objetivo del Proyecto: **Obtener derivados esteroidales candidatos a fármacos antiinflamatorios y antiparasitarios.**

A continuación, se realiza un análisis de como se han cumplimentado las actividades propuestas para alcanzar los resultados planificados

**Resultado 1: Obtenidos nuevos derivados de saponinas/sapogeninas esteroidales mediante biotransformaciones y el uso de herramientas de síntesis orgánica.**

**Actividades:**

**1.1 Aislamiento de saponinas y sapogeninas esteroidales presentes en las especies de agaves en estudio.**

Los estudios fitoquímicos inicialmente se extendieron a varias especies de la familia Agavaceae pero teniendo en cuenta los resultados alcanzados, así como la disponibilidad del material vegetal, nos centramos en *Agave brittoniana* T. ssp brachypus.

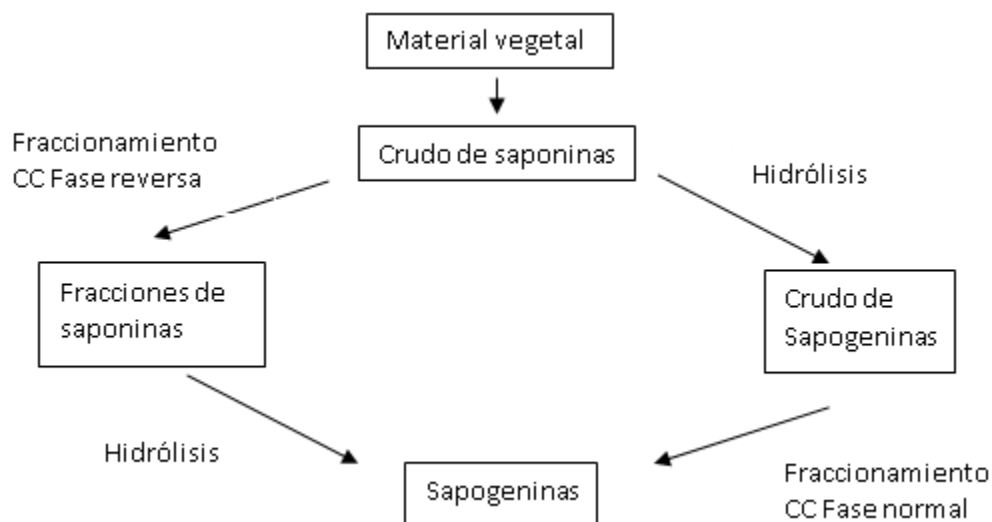


*Agave brittoniana* T ssp. brachypus

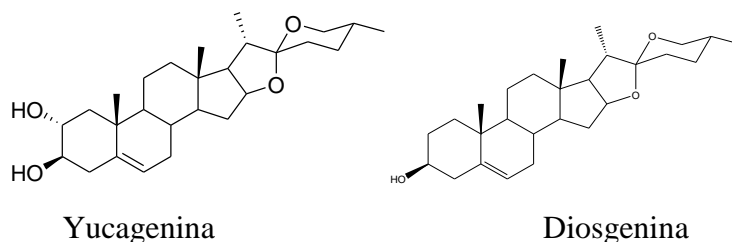
Se establecieron las condiciones para realizar las colectas de las hojas de la planta, así como el secado y molienda de las mismas para la posterior obtención, primero de un extracto hidroalcohólico y luego de un extracto rico en saponinas esteroidales o “crudo de saponinas”.

El “crudo de saponinas” fue sometido a hidrólisis química para obtener sapogeninas esteroidales y a fraccionamiento mediante cromatografía de columna para obtener saponinas con mayor grado de pureza.

Los procedimientos referidos se esquematizan en la siguiente figura:



Así se aislaron y caracterizaron más de 30 saponinas y 7 sapogeninas esteroidales, aunque para el desarrollo de este proyecto nos centramos fundamentalmente en la Yucagenina y la Diosgenina, teniendo en cuenta los antecedentes de sus actividades biológicas, por lo que se trabajó en el perfeccionamiento de los métodos de obtención de las mismas.



La yucagenina es una sapogenina esteroidea que se diferencia de la diosgenina sólo en la presencia de un grupo hidroxilo en C-2. La diosgenina es un producto que se comercializa como reactivo y en formas farmacéuticas por su actividad antiinflamatoria y otras. Es precursora en la síntesis de hormonas y otros derivados. La yucagenina ha sido menos estudiada.

**Resultado obtenido: Se establecieron los procedimientos para la obtención de yucagenina, diosgenina y saponinas derivadas de estas.**

## **1.2 Modificación de la estructura molecular utilizando biotransformaciones y procedimientos de síntesis orgánica.**

Biotransformaciones:

Teniendo en cuenta los resultados de estudios teóricos se trabajó en la modificación de la estructura de la yucagenina y la diosgenina, buscando potenciar su actividad biológica.

Para este fin y teniendo en cuenta los antecedentes bibliográficos, se seleccionaron procedimientos de biotransformaciones utilizando hongos. Inicialmente se realizaron ensayos con nueve cepas, se evaluó el crecimiento del hongo y la formación de nuevos compuestos mediante un estudio por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) a partir de lo cual se seleccionó el hongo *Aspergillus niger* para continuar la investigación.

Para la selección de las condiciones de trabajo se variaron parámetros, entre ellos el inóculo, medio de cultivo, rango de temperatura y tiempo de transformación.

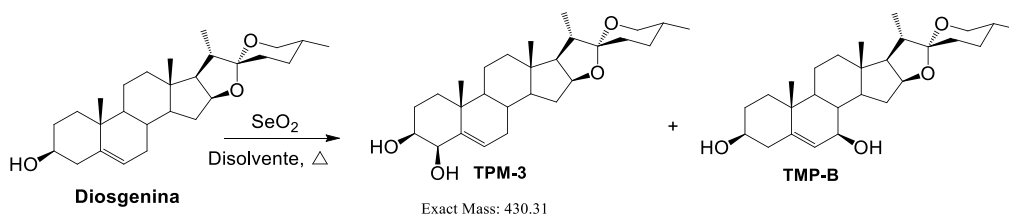
En todos los casos, al finalizar el proceso se procedió a la separación del micelio y la extracción del mismo y del residuo acuoso utilizando acetato de etilo para obtener mezclas conteniendo los compuestos biotransformados y otros productos derivados de estos procesos. Utilizando Cromatografía de Columna (CC) y Cromatografía Líquida a Media Presión (MPLC) fueron semipurificados estos compuestos.

**Resultado obtenido:** Se establecieron las condiciones para obtener derivados de yucagenina y diosgenina mediante biotransformaciones a nivel de laboratorio, utilizando el hongo *A. niger*.

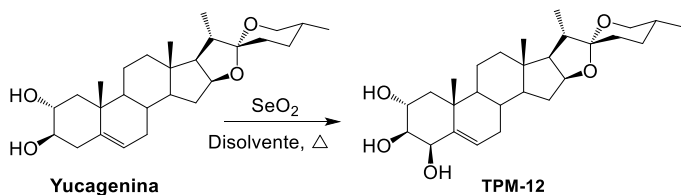
### Síntesis:

Teniendo en cuenta los resultados de los estudios teóricos que señalaban que la oxidación de los esqueletos esteroidales en determinadas posiciones potenciaban la actividad antiinflamatoria de estos productos, se procedió a estudiar lo que aparece en la literatura sobre este particular. Se escogieron reacciones en las que se utilizan indistintamente o de forma combinada el reactivo de Jones y el dióxido de selenio, así como el ácido metacloroperbenzoico. Las mismas se estudiaron utilizando tanto métodos convencionales con calentamiento a reflujo, como reacciones asistidas por microondas. Las moléculas de partida fueron yucagenina y diosgenina; se obtuvieron varios compuestos, siendo los que a continuación se relacionan los de mayor rendimiento y que pudieron ser aislados de las mezclas de reacciones.

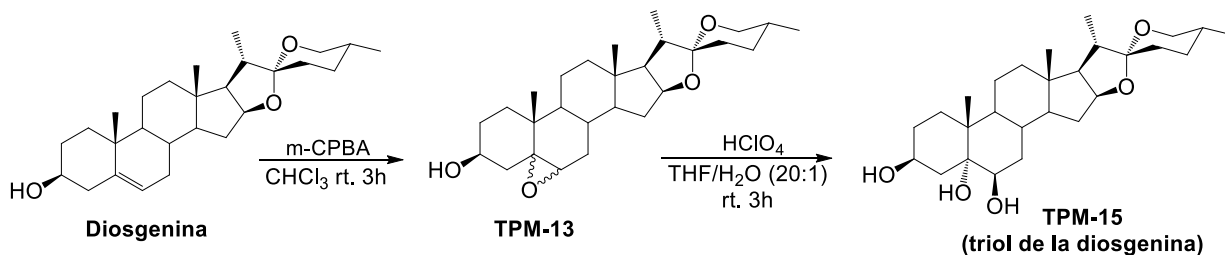
#### a) Obtención de TMP-3



### b) Obtención de TMP-12



### c) Obtención de TPM-15



En todos los casos se constataron las ventajas, a nivel de laboratorio, del uso de microondas, teniendo en cuenta el menor tiempo de reacción y mayor rendimiento.

**Resultado obtenido:** Se establecieron procedimientos sintéticos para la obtención de derivados hidroxilados de yucagenina y diosgenina, con potencial actividad antiinflamatoria.

### 1.3 Caracterización molecular de los productos obtenidos.

Todos los compuestos de partida fueron debidamente caracterizados utilizando técnicas espectroscópicas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Espectrometría de masas y Espectroscopia Infrarroja. Los derivados obtenidos por biotransformaciones han sido estudiados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y placa delgada (CCD) y los derivados sintéticos por RMN y HPLC. Aun se trabaja en la confirmación de alguna de las estructuras.

#### Determinación cuantitativa de sapogeninas esteroidales.

Paralelamente a todo lo anterior se desarrolló de una metodología analítica para cuantificar este tipo de compuestos, teniendo en cuenta la necesidad de conocer las concentraciones de los mismos en los ensayos de actividad biológica. Se establecieron condiciones operacionales por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la determinación de diosgenina, con columna C18, fase móvil ACN:agua 90:10 (v.v), flujo 1mL/min y detección a 203 nm,

obteniéndose linealidad adecuada en el intervalo de concentraciones entre 0,005 y 0,15 mg/mL. Se aplicó la metodología para la detección de sapogeninas esteroidales presentes en el extracto butanólico hidrolizado de hojas de *A. brittoniana*.

**Resultado obtenido: Se dispone de un método para la determinación cuantitativa de sapogeninas esteroidales utilizando la cromatografía líquida de alta resolución y un patrón de diosgenina.**

## **Resultado 2: Seleccionados compuestos promisorios por sus actividades antiinflamatoria y antiparasitaria.**

### **Actividades:**

#### **2.1 Estudios teóricos y computacionales para seleccionar las estructuras potencialmente bioactivas.**

Con el objetivo de guiar la investigación, desde que se tuvieron los primeros resultados de actividad antiinflamatoria se realizaron estudios cuantitativos estructura-propiedad (QSPR) para identificar cuáles de estas moléculas aisladas de la planta presentaban mayor grado liposolubilidad, y a través de estudios cuantitativos estructura-actividad (QSAR) predecir un posible efecto antiinflamatorio.

El modelo QSPR se desarrolló para predecir el coeficiente de partición 1-octanol/agua y el modelo QSAR para predecir la inhibición de la enzima convertidora del factor de necrosis tumoral alfa (ADAM-17), empleándose luego para el cribado computacional de las sapogeninas esteroidales. Los programas empleados en la modelación fueron DIVATI, DRAGON, STADISTICA y MOBYDIGS

Los resultados fueron satisfactorios; en el estudio QSPR se obtuvo un modelo de regresión lineal múltiple que correlacionó favorablemente la propiedad modelada ( $R^2=96,52$ ), revelando que las moléculas con mayor liposolubilidad eran las sapogeninas esteroidales. Esto permitió inferir su posible comportamiento en el entorno de los fluidos biológicos del organismo, y emplear las mismas en el estudio QSAR. El modelo QSAR mostró buena capacidad predictiva ( $Q_{ext}=52,22\%$ ) y predijo de manera eficaz el potencial de inhibición en todas las sapogeninas frente al ADAM-17, siendo la yucagenina, clorogenina y rockogenina las de mejores resultados.

Estos modelos QSPR/QSAR fueron robustos y estables, con un alto valor predictivo de la liposolubilidad y actividad antiinflamatoria de las saponinas y sapogeninas esteroideas.

A partir de estos resultados, utilizando el modelo QSAR se realizó la predicción de la actividad antiinflamatoria de derivados sintetizables de yucagenina y diosgenina, y así obtener información acerca de cómo influyen las variaciones estructurales sobre dicha propiedad. Los estudios computacionales indicaron que derivados polihidroxilados de estas sapogeninas pueden presentar una actividad antiinflamatoria potenciada con respecto a sus precursores naturales por lo que con estos resultados y lo que aparece en la literatura al respecto dirigimos el trabajo a la obtención de compuestos de este tipo, tanto a través de síntesis orgánica como biotransformaciones utilizando hongos.

Los estudios computacionales también incluyeron la actividad antihelmíntica por lo que se creó y validó un modelo QSAR capaz de identificar moléculas capaces de actuar frente a *Fasciola hepatica*. El modelo obtenido clasificó correctamente el 87,46% y el 81,82% de los conjuntos de datos externos y de entrenamiento, respectivamente y se utilizó en un cribado virtual para predecir la actividad biológica de las moléculas aisladas de *A. brittoniana*. Los compuestos que mostraron los mejores resultados fueron sometidos a ensayos “*in vitro*” e “*in vivo*”.

**Resultado obtenido: A través de estudios computacionales se crearon y validaron modelos teóricos que permiten la selección “*in silico*” de moléculas con actividades antiinflamatorias y antihelmíntica.**

## **2,2 Desarrollo de estudios “*in vivo*” para determinar la actividad antiinflamatoria.**

Para la evaluación de la actividad antiinflamatoria se utilizaron los siguientes protocolos

- Modelo agudo de edema plantar inducido por carragenina
- Modelo crónico de granuloma inducido por pellet de algodón
- Colitis Ulcerativa Aguda

Estos son estudios “*in vivo*” para los cuales se utilizan ratas de laboratorio. Se evaluaron extractos y compuestos aislados de las hojas de la planta. En estos momentos se están evaluando otros compuestos obtenidos mediante biotransformaciones o por síntesis orgánica por lo que estos resultados no aparecen en este informe

La indometacina y prednisolona fueron los compuestos anti inflamatorios de referencia, aunque también en el análisis se realizaron comparaciones del resto de los compuestos evaluados con la diosgenina teniendo en cuenta su demostrada actividad antiinflamatoria.

De forma general las saponinas y sapogeninas obtenidos del *Agave brittoniana* T. ssp. *brachypus* mostraron buenos resultados, destacándose la molécula de yucagenina y las saponinas derivadas de esta, con resultados mejores que la diosgenina y los compuestos de referencia en alguno de los protocolos empleados.

En otro proyecto de investigaciones que actualmente realizamos en la UCLV se ha trabajado en la seguridad toxicológica y la formulación de una crema antiinflamatoria para uso veterinario que tiene como principio activo estas sapogeninas y que está en fase de pruebas.

**Resultado obtenido: Mediante ensayos a nivel de laboratorio se demuestra la actividad antiinflamatoria de extractos y productos aislados de *A. brittoniana*, particularmente en el caso de la yucagenina y las saponinas derivadas de la misma.**

### **2.3 Desarrollo de estudios “in vivo” para determinar la actividad antiparasitaria.**

Se realizaron estudios “*in vitro*” e “*in vivo*” para determinar la actividad frente a *F. hepatica* de sapogeninas y saponinas aisladas de la planta en estudio. En ambos casos el tricabendazol, fármaco antiparasitario, fue utilizado como referencia.

En los ensayos “*in vitro*” se evaluaron los extractos n-butanólicos a 500 µg/ml, se obtuvo un 100 % de efectividad y 0 % de ovoposición. Teniendo en cuenta estos buenos resultados se procedió a la realización de evaluaciones “*in vivo*” utilizando productos con mayor grado de pureza.

Para esto los ratones fueron artificialmente infectados con *F. hepatica* y tratados con los productos a evaluar a 25 mg/kg de peso vivo.

El sacrificio de los animales se efectuó, por dislocación cervical, al séptimo día después de administrar el producto, tomándose con anterioridad el peso de los mismos. Se determinó la diferencia en el peso de los animales el día de la infección inicial y al final del experimento, el índice hepático y el peso del bazo. Se realizó el conteo de faciolas vivas en los grupos de animales tratados con los productos de agave y de los controles, determinándose la efectividad del tratamiento.

Como resultados de este experimento se determinaron tres compuestos aislados de la planta que presentaron actividad comparable al Tricabendazol, droga comercial usada como referencia.

**Resultado obtenido: Se constató la presencia en la planta en estudio, de saponinas esteroidales con buena actividad frente a *F. hepatica*.**

### **Resultado 3: Capacitados los recursos humanos que participan en el proyecto.**

#### **Actividades:**

#### **3.1 Contribuir a la defensa exitosa de tesis de maestría y doctorado**

Tesis que se relacionan con las investigaciones del proyecto y que se defendieron exitosamente

- 1) Tesis doctoral, programa “Ciencias básicas como fundamento de las clínicas médicas”. Título: “Cambios morfofuncionales en un biomodelo experimental de Síndrome Metabólico en diferentes etapas del desarrollo”. Autora: Ms.C. Yisel González Madariaga. Tutoras: Dra. C. María Boffil Cárdenas; Dra.C. Leisy Nieto Reyes
- 2) Tesis de maestría, programa “Desarrollo de Medicamentos de Origen Natural. Título: “Obtención de derivados de saponinas esteroidales con potencial actividad antiinflamatoria”  
Autora: Lic. Arlena Vázquez Martín.  
Tutor: Dr. C. José Orestes Guerra de León
- 3) Tesis de maestría, programa “Desarrollo de Medicamentos de Origen Natural. Título: “Formulación de una crema antiinflamatoria de Agave brittoniana Trel.”  
Autora: Lic. Laura Isaac Crespo.  
Tutoras: Dra.C Mirtha Mayra González Bedia; Dra.C. Leisy Nieto Reyes
- 4) Tesis de maestría, programa “Desarrollo de Medicamentos de Origen Natural. Título: “Efecto antiinflamatorio de saponinas esteroidales de Agave brittoniana en un modelo de síndrome metabólico experimental”.  
Autora: Tania Llerena Bernal  
Tutoras: Dra.C Yisel González Madariaga; Dra.C. Leisy Nieto Reyes
- 5) Varios trabajos de diploma y de curso

#### **3.2 Desarrollo de cursos y talleres presenciales y de forma “on line”**

Se desarrollaron las siguientes actividades:

- Charlas presenciales a estudiantes de doctorado de Química y Veterinaria en UFMG
- Charla “on line” a grupo de investigaciones de Productos Naturales en UTP
- Curso presencial a estudiantes de pre y post grado en UCLV

- Taller con la participación de investigadores de Cuba, Brasil y Colombia en la UCLV.
- Reuniones sistemáticas de los grupos de investigaciones.

### 3.3 Realizar presentaciones en eventos científicos y publicaciones en revistas de

#### Impacto

Publicaciones vinculadas al proyecto:

“Anti-inflammatory activity: in silico and in vivo of sapogenins present in *Agave brittoniana* subsp. *brachypus* (Trel)” en *Antiallergy Agents Med. Chem.* 2023.

“Experimental Pharmacology Assessment of *Agave brittoniana* Trel in ulcerative colitis” *Journal of Research in Pharmacy* . (2024) 28(6)(28(6)):1963-1973. DOI: [10.29228/jrp.870](https://doi.org/10.29228/jrp.870)

“Computational discovery of novel anthelmintic natural compounds from *Agave brittoniana* trel. spp. *brachypus*” *Revista Bionatura* 2022;7(4) 53.  
<http://dx.doi.org/10.21931/RB/2022.07.04.53>

Eventos:

Se presentaron 6 trabajos a Convención UCLV 2023. 13 al 17 de noviembre de 2023. Cayo Santa María. Cuba

- “Potencial de *aspergillus niger* ccibp g-1 para la biotransformación de saponinas esteroidales de *Agave brittoniana*” Mileidy Cruz Martín. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Cuba
- “Estudio de biotransformaciones en esqueletos esteroidales utilizando el hongo *Aspergillus niger*” José Ramón Chávez Cámara. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Cuba
- “Modelación QSPR/QSAR de saponinas y sapogeninas esteroidales para la predicción de actividad antiinflamatoria.” Arlena Vázquez Martín. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Cuba
- “Alternativas en el aislamiento de yucagenina de *A. brittoniana* T.” Yaimy Santana Pérez. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Cuba
- “Obtención de derivados de diosgenina con potencial actividad antiinflamatoria” Ada María del Rosario Silva. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Cuba

- “Desarrollo de un método de cromatografía líquida de alta eficacia para la determinación de diosgenina” Leisy Nieto Reyes Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Cuba

Se presentaron cuatro trabajos en XV Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal. 7 al 10 de mayo de 2024. Varadero. Cuba.

- “Biotransformaciones de hongos como herramienta para aumentar la diversidad estructural de diterpenos para la obtención de candidatos a nuevos productos agrobiotecnológicos”. Jacqueline Aparecida Takahashi. Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil
- “Caracterización de los metabolitos secundarios de extractos de los hongos endofíticos *Coprinellus radians* y *Colletotrichum fructicola* de *Morus alba* (Moraceae)” Oscar Marino Mosquera Martínez et al. Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia
- “Estudio de biotransformaciones en sapogeninas esteroideas utilizando el hongo *Aspergillus niger*” José Orestes Guerra de León et al., Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Cuba
- “*Aspergillus niger* as an effective agent for biotransformation of the diterpenoid isosteviol. Bruna A Martins, Jacqueline A Takahashi Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil

### **3,4 Intercambiar especialistas entre los países integrantes del proyecto**

Se realizó una estancia de del Profesor Dr. José Orestes Guerra de León y del Lic. José Ramón Chávez Cámara, ambos de la UCLV a la UFMG en Brasil.

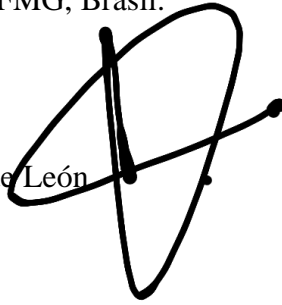
Visitaron la UCLV en Cuba los profesores Dra. Jacqueline A Takahashi de la UFMG y Oscar Marino Mosquera Martínez de la UTP

### **ACTIVIDADES DE CAPACITACION DE RECURSOS HUMANOS**

Se organizaron actividades de capacitación para el trabajo con hongos en el Instituto de Biotecnología de las Plantas de la UCLV, dirigidas a estudiantes de maestría y pregrado vinculados al proyecto.

Un estudiante de maestría cubano recibió capacitación en microbiología y procedimientos de biotransformaciones en la UFMG, Brasil.

Dr. C. José Orestes Guerra de León  
Coordinador del Proyecto

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke extending to the right.